Über das Potential und die sogenannte irreziproke Permeabilität der Froschhaut

---

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde

der hohen medizinischen Fakultät der Universität Basel

vorgelegt von

Albert Zeller

von Basel

BASEL

Buchdruckerei Emil Birkhäuser & Cie.

1934

Über das Potential und die sogenannte irreziproke Permeabilität der Froschhaut

---

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der hohen medizinischen Fakultät der Universität Basel

vorgelegt von

Albert Zeller
von Basel

BASEL
Buchdruckerei Emil Birkhäuser & Cie.
1934

Von der medizinischen Fakultät der Universität Basel genehmigt auf Antrag von Herrn Prof. Dr. S. Edlbacher.

Tag der Promotion: 11. Juli 1933.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Über das Potential und die sogenannte irreziproke Permeabilität der Froschhaut.

1. Einleitung.

Es gibt im Tier- und Pflanzenreich Membrane, die die merkwürdige Eigenschaft besitzen, dass sie Stoffe in der einen Richtung besser durchlassen als in der andern, oder überhaupt nur in einer Richtung. Vielleicht besitzt jede Zellgrenze diese Eigenschaft, die man als irreziproke Permeabilität (i. P.) bezeichnet. Über diesen Ausdruck besteht jedoch eine gewisse Unklarheit, weil mit ihm nicht von vorneherein zusammengehörende Begriffe bezeichnet werden. Als Beispiel für eine i. P. nenne ich den klassischen Cohnheim'schen Versuch (1): Füllt man eine Darmschlinge mit Kochsalzlösung, so wird das Kochsalz resorbiert; füllt man sie mit Zuckerlösung, so bleibt dieselbe vollständig chlorfrei, trotzdem das Blut kochsalzhaltig ist.

2. Ungleicher Filtrationswiderstand und irreziproke Permeabilität im engern Sinne.

Man hat zuerst versucht, die i. P. mechanisch zu erklären, z. B. durch verschiedene Form des Porenquerschnitts auf beiden Seiten, trichterförmige Lumina der Poren usw. (2, 3). Diese Anschauung kann aber höchstens für den Fall des ungleichen Filtrationswiderstandes gelten. Wenn man nämlich Flüssigkeiten oder Lösungen durch bestimmte Membrane, z. B. durch die Schale der Rosskastanie (4), oder durch die Froschhaut (5) unter einem gewissen Druck hindurchpresst, so ist der Widerstand ein verschiedener je nach der Richtung. Brauner bezeichnet diese Erscheinung als passive polare Permeabilität. Wir aber definieren, dass eine Membran dann die Eigenschaft der irreziproken Permeabilität besitze, wenn sie der Diffusion in beiden Richtungen einen verschiedenen Widerstand entgegensetzt. Denkt man sich zu beiden Seiten einer solchen Membran gleich konzentrierte Lösungen, und tritt wegen des in beiden Richtungen ungleichen Diffusionswiderstandes eine konzentriertere Lösung auf einer Seite auf, so braucht dieser Vorgang Energie. Diese „Konzentrationsarbeit" leistet die Membran; sie besitzt demnach eine

„aktive Triebkraft". Es ist also i. P. gleichbedeutend mit dem Nachweis einer aktiven Triebkraft (Leuthardt (5)). Eine mechanische Deutung der i. P. ist somit ausgeschlossen. Trotz dieses Unterschiedes zwischen i. P. und ungleichem Filtrationswiderstand bestehen zwischen ihnen wahrscheinlich enge Zusammenhänge.

3. Experimenteller Nachweis der aktiven Triebkraft.

Der experimentelle Nachweis der aktiven Triebkraft ist sehr schwierig. Es handelt sich um sehr geringe Konzentrationsdifferenzen, die innerhalb der Fehlergrenzen der quantitativen Methoden liegen. Beobachtete Konzentrationsdifferenzen können auch daher stammen, dass Salze von der Membran elutiert oder aufgenommen werden, dass die beiden Seiten der Membran verschiedene Mengen Wasser aufnehmen (2) usw. Überdies wird ein Teil der zu untersuchenden Stoffe durch die Membran verändert. So wird Glukose oxydiert und Methylenblau reduziert. Es gibt daher Autoren, die bezweifeln, dass der Nachweis der aktiven Triebkraft geglückt sei, wie man das früher z. B. nach den Versuchen von Reid (6) angenommen hat.

4. Die Wertheimer'schen Versuche.

Wertheimer hat für die grosse Zahl seiner Versuche zum Studium der i. P. eine andere Anordnung gewählt. Er füllte Säcke aus Schenkelhaut von Fröschen z. B. mit in Ringer gelöstem Methylenblau und hängte sie in Ringerlösung. Dabei stellte er fest, dass das Methylenblau nach aussen diffundiert. Stülpt man aber diese Schenkelsäcke um, so dass die Innenseite nach aussen sieht, und füllt sie wieder mit Methylenblau, so tritt sehr viel weniger Farbstoff in die Aussenlösung. Wertheimer konnte auf diese Weise z. B. zeigen, dass die Permeabilität für Glukose verändert und ins Gegenteil gekehrt werden kann durch einfache Änderung der Bedingungen (Tabelle 1, erste Kolonne).

Durch unsere Versuche (ausgeführt zusammen mit Priv-Doz. Dr. Leuthardt) konnte wahrscheinlich gemacht werden, dass zur Erklärung der Wertheimer'schen Ergebnisse die Annahme einer irreziproken Permeabilität s. s. nicht nötig ist, was übrigens schon daraus hervorgeht, dass die Annahme einer aktiven Triebkraft keine conditio sine qua non darstellt. Die Durchlässigkeit für den Farbstoff ist verschieden, je nachdem der Farbstoff mit der Innen- oder mit der Aussenseite in Berührung steht, d. h. die Innen- und die Aussenseite reagieren verschieden auf den Farb-

stoff. Wichtig scheint uns die Tatsache zu sein, dass sich mit den basischen Farbstoffen wie Methylenblau, die von innen nach aussen leichter durchgehen als in umgekehrter Richtung, die Aussenseite der Haut intensiv anfärbt, indes die Innenseite keinen Farbstoff aufnimmt. Der Farbstoff diffundiert rascher, wenn die

Tabelle 1.

Hautinnenseite	Hautaussenseite	Durchlässigk. f. Glukose	Potential
Isotonische Glukoselösung	Ringer	++	−8
Ringer	Isotonische Glukoselösung	0	−45
Isotonische Glukoselösung	Aqua dest.	+	+70
Aqua dest.	Isotonische Glukoselösung	++	+20
Isoton. Glukose + Ringer	Ringer	0	−5
Ringer	Isoton. Glukose + Ringer	0	+2
Isoton. Glukose + Ringer	Aqua dest.	0	+70
Aqua dest.	Isoton. Glukose + Ringer	++	+3

angefärbte Aussenseite der farbstoffreien Lösung, als wenn sie der farbstoffhaltigen Lösung zugekehrt ist. Es bildet sich wohl primär ein Adsorbat an irgendwelche Bestandteile der äussern Zelloberfläche. Die Elution erfolgt leichter, wenn diese Adsorptionsschicht der farbstoffreien Lösung direkt zugekehrt ist, als wenn das ganze Bindegewebe der Hautinnenseite dazwischen liegt. Aber auch Elektrolyte üben einen Einfluss auf die Permeabilität aus, wie das Beispiel von WERTHEIMER auf Tabelle 1 zeigt: Eine Permeabilität für Zucker ist nur dann vorhanden, wenn die Lösung, die die Innenseite berührt, elektrolytfrei ist. Auch unsere Untersuchungen über das Froschhautpotential haben ein ähnliches Ergebnis: Wie auf Tabelle 2 zu sehen ist, ist die Änderung des Potentials eine andere, wenn die Konzentration auf der Innenseite, als wenn sie auf der Aussenseite verändert wird.

Obwohl es wahrscheinlich ist, dass die Froschhaut die Eigenschaft der i. P. im oben definierten Sinne besitzt, können die Wertheimer'schen Versuche nicht mit diesem Begriffe gedeutet werden.

5. Irreziproke Permeabilität und Elektrizität.

Ein weiterer Erklärungsversuch (8) für die i. P. benützt die elektrische Spannung, die sich z. B. von der Froschhaut ableiten lässt, wie das im nächsten Abschnitt ausgeführt wird. Negativ geladene Teilchen (Anionen) wandern auf die positive, positiv geladene auf die negative Seite der Membran; jedoch haben Leuthardt (9) und andere (Wowsi (10), Amson (11)) keinen direkten Zusammenhang feststellen können. Ein Beispiel dafür haben auch unsere Versuche gegeben: Wertheimer hat, wie im 4. Abschnitt ausgeführt wurde, eine Änderung und Umkehr der

Tabelle 2.

Innenlösung	Aussenlösung	Spannung
Ringer	Ringer	−45 M.V.
„	0,01 m KCl	+ 8 „
„	aq. dest.	+92 „
0,01 m KCl	Ringer	−18 M.V.
„	0,01 m KCl	− 1 „
„	aq. dest.	+44 „
aq. dest.	Ringer	−10 M.V.
„	0,01 m KCl	− 9 „
„	aq. dest.	+60 „

Durchlässigkeit für Zucker erzielt. Wir haben die jedem Versuch entsprechende Spannung gemessen und wie Tabelle 1, 2. Kolonne, zeigt, keine irgendwie gleichsinnige Veränderung der Spannung bei Umkehr der Permeabilität gefunden.

6. Methodisches zum Studium des Froschhautpotentials.

Wir haben im Hinblick auf die i. P. die Spannung der Froschhaut unter verschiedenen Bedingungen untersucht. Ergebnisse unserer Versuche sind schon in den Abschnitten 4 und 5 erwähnt. Es wird die Bauchhaut eines dekapitierten Frosches zwischen die Ränder von 2 Glasgefässen, die mit Federdruck gegeneinander gepresst werden, eingespannt. Die Spannung wird mit gesättigten Kalomelelektroden auf ein Lindemann-Elektrometer (12) in Nadelschaltung übertragen, dessen Empfindlichkeit durch verschieden starkes Aufladen der Quadranten so eingestellt wird, dass noch Millivolt (M.V.) abgelesen werden können. Zuerst

werden die beiden Elektrodengefässe mit Ringerlösung gefüllt und diese mit Sauerstoff gesättigt. Die dabei auftretende Spannungsdifferenz von 20 bis 70 M. V. wird als Vergleichsspannung benützt.

7. Die zwei Komponenten des Froschhautpotentials.

Wenn man, wie es Lund (13) und Leuthardt (9) getan haben, den Sauerstoff durch reinen Stickstoff aus den Elektrodenflüssigkeiten verdrängt, so vermindert sich die Spannungsdifferenz um 10—40%, um wieder anzusteigen, wenn Sauerstoff hinzugeleitet wird. Dieser Teil der Spannungsdifferenz scheint also mit der Lebenstätigkeit, besonders der Atemtätigkeit der Zelle, zusammenzuhängen. Die Reaktion, die ein feiner Indikator für den Lebenszustand der Haut bildet, verschwindet nach ein paar Stunden. Der übrige Teil ist rein physikalisch bedingt; denn sicher tote Häute

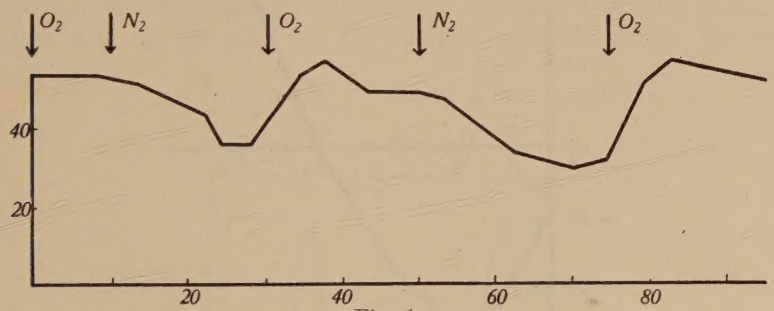

Fig. 1.

Verlauf der Potentialdifferenz, wenn der Sauerstoff durch Stickstoff vertrieben wird. Abszisse: Zeit in Minuten. Ordinate: Millivolt.

zeigen manchmal noch eine beträchtliche Spannungsdifferenz. Kürzlich hat auch Francis (14) die Ansicht geäussert, dass das Potential der Froschhaut aus diesen zwei Komponenten zusammengesetzt sei. Über den durch die Zellatmung bedingten Teil wissen wir noch nichts genaueres; die von Lund angegebene Erklärung hat sich als falsch erwiesen (falsche Anwendung des Begriffs des Oxydo-reduktionspotentials). Hingegen lässt sich über die andere, physikalische Komponente schon einiges aussagen.

8. Die physikalisch-chemische Komponente des Froschhautpotentials.

Zur Erklärung derselben verweise ich auf die Zahlen der Tabelle 2. Wenn auf beiden Seiten Ringerlösung ist, so ist die Aussenseite negativ gegenüber der Innenseite. Ist auf beiden Seiten destilliertes Wasser, so wird die Aussenseite positiv. Ist

innen Ringerlösung und aussen destilliertes Wasser, so wird die Aussenseite noch stärker positiv. Diese Verhältnisse lassen sich vollständig in Übereinstimmung mit den Angaben von MICHAELIS (15) und BRAUNER (l. c.) bringen. Die Micellen des Membraneiweisses sind wie die Micellen der Kastanienschale und der Kollodiummembran negativ geladen. Sie setzen dem Eindringen der negativ geladenen Anionen in das Gel einen höhern Widerstand entgegen als den Kationen. Da nun die Aussenseite, bedeckt von der Epidermis, viel dichter ist als die lockere Subcutis, so setzt sie dem Eindringen der Anionen einen stärkeren Widerstand entgegen als die Innenseite. Es bleiben darum in der Aussenflüssigkeit

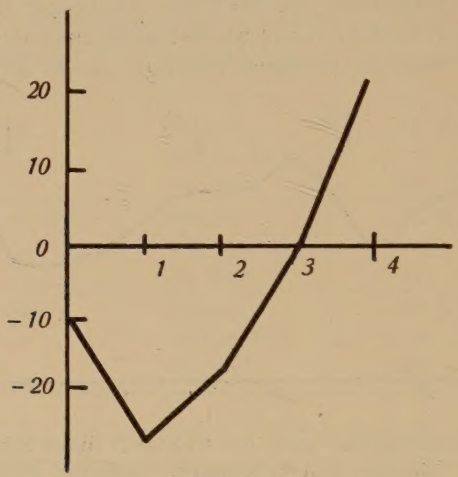

Fig. 2.
Umladung der Haut durch $AlCl_3$. Abszisse: Negativer Logarithmus der molaren Konzentration. Ordinate: Spannung in M. V.

im Verhältnis zu den eingewanderten Kationen weit mehr Anionen zurück als in der Innenflüssigkeit, d. h. die Aussenseite ist negativ geladen gegen die Innenseite. Werden nun beide Seiten von destilliertem Wasser bespült, so gehen die Kationen infolge ihrer grössern Beweglichkeit innerhalb der Membran in grösserer Zahl ins Wasser über als die Anionen, und aus dem gleichen erwähnten Grunde werden es mehr positive Kationen auf der Aussenseite sein als auf der Innenseite, d. h. die Hautaussenseite erscheint positiv gegenüber der Innenseite.

Dringen nun sehr viele positive Kationen in die Froschhaut hinein, so kommt es, wahrscheinlich durch Adsorption der positiven Kationen an die negativ geladenen Micellen, zu einer Umladung

derselben, was zur Folge hat, dass nun die Beweglichkeit der Anionen gegenüber den Kationen in der Membran erhöht ist. Als weitere Folgen müssen auch die Spannungsverhältnisse gerade umgekehrt sein, was wir auch tatsächlich gefunden haben. Diese Umladung ist besonders leicht mit mehrwertigen Kationen ($AlCl_3$) zu erreichen. Bei geringen Konzentrationen ist die Aussenseite, wie bei Ringerlösung, negativ geladen gegen die Innenseite. Mit zunehmender Konzentration von $AlCl_3$ nimmt diese Spannungsdifferenz zwischen beiden Seiten ab, und von einer Konzentration von ca. 0,1 m an wird die Aussenseite positiv gegenüber der Innenseite.

9. Froschhautpotential und Alkohole.

Die aliphatischen Alkohole vermindern die Spannungsdifferenz zwischen aussen und innen, und zwar um so mehr, je länger ihre Kette ist. Geprüft haben wir die Reihe bis zum

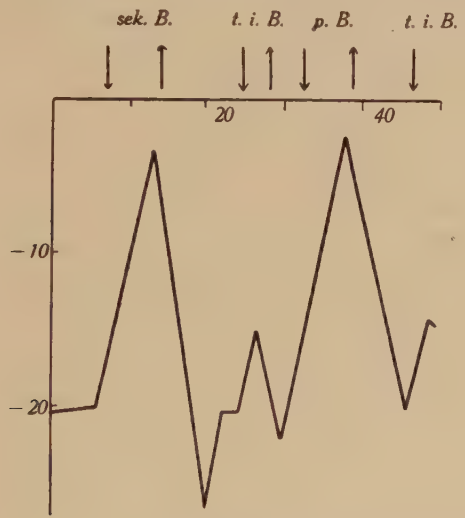

Fig. 3.
Unterschied der Wirkung zwischem primärem und sekundärem Butylalkohol einerseits und tertiärem Isobutylalkohol anderseits. Abszisse: Zeit in Minuten. Ordinate: Millivolt.

Amylalkohol. Isomere Alkohole wirken meistens schwächer als die normalen (siehe Figur 3). Da die Alkohole ebenfalls mit zunehmender Kettenlänge oberflächenaktiver werden, d. h. stärker an Oberflächen adsorbiert werden, so ist es wahrscheinlich, und

die im vorigen Abschnitt entwickelte Theorie unterstützt diese Ansicht, dass diese gesetzmässige Herabsetzung des Froschhautpotentials durch Alkohole mit deren Oberflächenaktivität zusammenhängt.

10. Der Einfluss von Chloroform, Schwefelwasserstoff und Kaliumcyanid auf das Froschhautpotential.

Diese Stoffe vermindern die Potentialdifferenz reversibel, wenn die Einwirkung nur kurze Zeit dauert und wenn die Konzentration eine geringe ist. Hält man sich aber nicht an diese Bedingungen, so sinkt das Potential auf 0.

Diese Stoffe beeinflussen beide Komponenten des Potentials: Sie hemmen die Lebenstätigkeit der Zellen und zerstören den feineren Aufbau der Membran, der nach obigem die Spannungsdifferenz zum grössten Teile bedingt.

Ich danke Herrn Priv-Doz. Dr. Leuthardt sehr für die vielen Anregungen und für die Hilfe, die er dieser Arbeit zuteil werden liess.

Literatur:

1. Cohnheim: Zeitschr. f. Biol. **37**, 443 (1899).
2. Júrišić: Biochem. Z. **258**, 449 (1933).
3. Leuthardt: Medizinische Kolloidlehre (Leipzig 1932), S. 100.
4. Brauner: Jb. Bot. **73**, 513 (1930).
5. Leuthardt: l. c. S. 99.
6. Reid: J. of Physiol. **26**, 436 (1901).
7. Wertheimer: Pflüger's Arch. **199**, 383 (1923). Protoplasma 2, 624 (1927).
8. Keller: Die Elektrizität in der Zelle, 3. Auflage (Mährisch-Ostrau 1932).
9. Leuthardt: Schweiz. Med. W'schr. **62**, 264 (1932).
10. Wowsi: Protoplasma **14**, 170 (1931).
11. Amson: Pflüger's Arch. **225**, 476 (1930).
12. Umrath: Protoplasma **9**, 576 (1930).
13. Lund: Journ. of Exper. Zool. **51**, 265 (1928); **60**, 249 (1931).
14. Francis: Nature **131**, 805 (1933).
15. Michaelis: Naturwiss. **14**, 33 (1926).
16. Rein: Z'schr. f. Biol. **85**, 195 (1927).